Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert Koch-Institutes Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

Orale und endovesikale Immunisierung mit hitzeinaktivierten Coli-Bakterien bei Ratten gegenüber einer retrograden Coli-Infektion der Nieren

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Slaheddine Gharbi

aus Beja/Tunesien

1976

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert Koch-Institutes, Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Jürgen Hedrich

Orale und endovesikale Immunisierung mit hitzeinaktivierten Coli-Bakterien bei Ratten gegenüber einer retrograden Coli-Infektion der Nieren

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
im Medizinischen Fachbereich
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mohamed Ghorab
aus Ägypten

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert Koch-Institutes Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

Orale und endovesikale Immunisierung mit hitzeinaktivierten Coli-Bakterien bei Ratten gegenüber einer retrograden Coli-Infektion der Nieren

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Slaheddine Gharbi

aus Beja/Tunesien

Referent : Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig
Korreferent : Professor Dr. D. Hartmann

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 13.12.1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meiner Frau und meinen Lehren gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	2
Versuchstiere	2
Impfstoff	2
Immunisierungsart	2
Infektion	2
Ergebnisse	5
Orale Immunisierung	7
Endovesikale Immuniserung	16
Diskussion	24
Zusammenfassung	28
Literatur	29

Einleitung

Das Bakterium Escherichia coli besitzt als Erreger von Harnwegsinfektionen eine große Bedeutung. Man kann, wie KROGIUS (25) schon im Jahre 1892 erkannt hatte, in 70-80% der besagten Infektionen Coli-Bakterien nachweisen. Wegen der Häufigkeit der Harnwegsinfektionen, die besonders im Säuglings- und Kleinkindsalter zum großen Teil nicht diagnostiziert werden, beschäftigte man sich mit der Frage einer möglichen Immunisierung.
Eine orale Immunisierung führt bekanntlich sowohl zu einer lokalen als auch zu einer allgemeinen Immunität. Nach vorherrschender Auffassung (26) sind zwei Typen der erworbenen Immunität gegen gramnegative Stäbchen zu unterscheiden. Die schnellauftretende und kurzdauernde Endotoxintoleranz sowie die erworbene Immunität vom klassischen Typ mit dem Nachweis zirkulierender typenspezifischer Antikörper (26). Weiterhin wurde von zahlreichen Autoren die Vermutung unterstüzt, daß in Gegenwart von Antiendotoxin oder zirkulierenden Antikörpern eine Reinfektion durch den homologen Stamm wenn nicht verhindert, so doch zumindest erschwert wird. SANFORD (26) bewies, daß die passive Immunisierung mit Kaninchenantiseren E. coli O 111, E. coli O 22, Klebsiella pneumoniae (Typ C) und Bact.proteus mirabilis, Ratten vor der hämatogenen Infektion mit den genannten Erregern und ebenso vor der retrograden Infektion durch Proteus mirabilis schützte.
Eine Modellpyelonephritis kann man durch intravenöse Injektion von Keimsuspension oder durch retrograde Keiminstillation erzeugen. Als Erreger bediente man sich nephropathogener Keime (Coli, Klebsiella, Pseudomonas und andere) (25, 26). So konnten Ratten, Kaninchen oder Mäuse (2,4,10,11,29) aktiv (2,4,10,11,45,47) oder passiv (10,41) immunisiert werden. Bei dieser Arbeit wurde der aszendierende Infektionsweg durch endovesikale Keiminstillation bei weiblichen Ratten gewählt. Der hierfür gewählte Infektionskeim E. coli O 2:1:4 soll als einziger und ohne hormonale Bahnung eine Infektionsrate von 77% verursachen (17, 39, 46, 47).

Die mir gestellte Aufgabe bestand darin, die Schutzwirkung einer oralen und endovesikalen Impfung eines aus dem hitzeinaktivierten Keim E. coli O 2:1:4 hergestellten Impfstoffs auf eine retrograde Infektion durch endovesikale Keiminstillation bei weiblichen Ratten zu untersuchen.

Material und Methoden

Versuchstiere:

Als Versuchstiere dienten 93 weibliche Albino-Wisterratten mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 200 g. Die Tiere wurden zu je 4-5 in einem Käfig gehalten. Als Nahrung erhielten sie Trockenfutter und Leitungswasser. Alle Käfige befanden sich in demselben Raum.

Impfstoff:

Es handelte sich um Kulturen von E. coli O 2:1:4, die auf 10^{10} Keime/ml eingestellt wurden und für 3 Minuten 100 C inaktiviert wurden. Sterilitätskontrollen wurden angeschlossen.

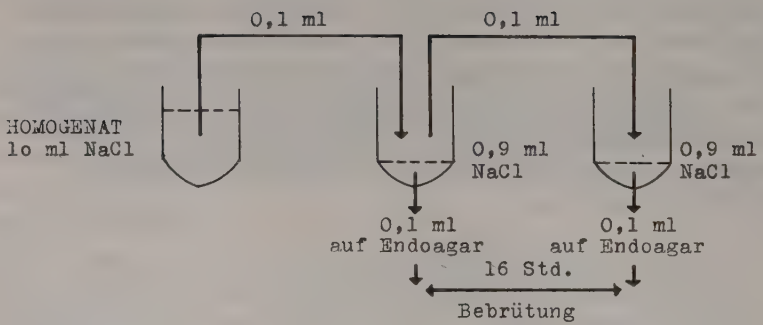
Immunisierungsart:

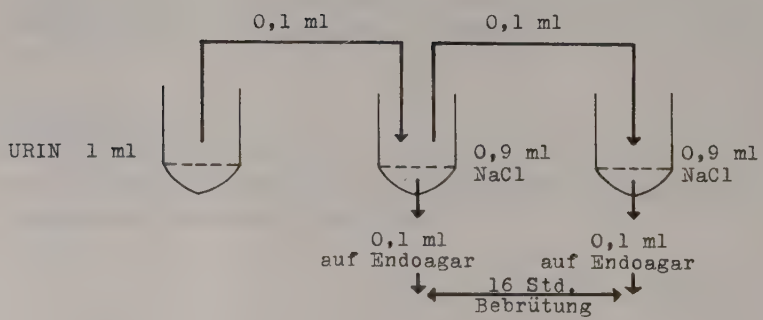
46 Tiere erhielten an 10 aufeinanderfolgenden Tagen je 0,25 ml Impfstoff oral mit einer kleinen gebogenen Knopfkanüle, so daß die Gesamtdosis 2,5 ml pro Tier betrug. Die endovesikale Impfung erfolgte durch eine 6malige Instillation von 1 ml Impfstoff transurethral endovesikal in Pentobarbitalnarkose jeweils mit einem Tag Pause zwischen zwei Gaben, so daß die Gesamtdosis 6 ml pro Tier betrug.

Infektion:

Am 7. und am 14.Tage nach der letzten Impfstoffgabe erhielten alle Tiere je 1 ml einer Suspension von 10^9 Keimen E. coli O 2:1:4 transurethral endovesikal instilliert.

Am 7.Tage nach der zweiten endovesikalen Keimgabe wurden jeweils 10 immunisierte und 10 Kontrolltiere und am 14.Tage 36 immunisierte und 37 Kontrolltiere in Narkose getötet und seziert. Zur Stimulierung der Diurese wurden jedem narkotisierten Tier 5 mg Furosemid (Lasix^{R}) intraperitoneal injiziert. Dies geschah jeweils 15 Minuten vor der Sektion. Zusätzlich wurde die Urethra mittels einer gebogenen Moskitoklemme verschlossen und somit für eine ausreichende Urinmenge in der Blase gesorgt. Es wurden bei jedem Tier unter aseptischen Kautelen 1 ml Urin durch Blasenpunktion gewonnen. Danach erfolgte die beidseitige Nephrektomie, und nach Dekapsulation der Nieren wurden diese auf makroskopische Veränderungen beurteilt und gewogen.
Anschliessend erfolgte die quantitativ-bakteriologische Analyse. Hierzu wurde jede Niere in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert. Aus jedem Homogenat wurde 0,1 ml entnommen und zu 0,9 ml physiologischer Kochsalzlösung gegeben (1.Verdünnung 10^{3}) und aus dieser wiederum 0,1 ml zu 0,9 ml physiologischer Kochsalzlösung gegeben (2.Verdünnung 10^{4}). (Vergleiche Skizze). Aus dem Urin wurde jeweils 0,1 ml zu 0,9 ml physiologischer Kochsalzlösung gegeben (1.Verdünnung) und aus dieser wiederum 0,1 ml zu 0,9ml physiologischer Kochsalzlösung gegeben (2.Verdünnung). Aus jeder Verdünnung (Homogenat und Urin) wurde jeweils 0,1 ml auf Endoagar überimpft. Die Beurteilung der Platten erfolgte nach 16stündiger Bebrütung.


0,1 ml
0,1 ml
HOMOGENAT
lo ml NaCl
0,9 ml
NaCl
0,9 ml
NaCl
0,1 ml
auf Endoagar
0,1 ml
auf Endoagar
16 Std.
Bebrütung


0,1 ml
0,1 ml
URIN 1 ml
0,9 ml
NaCl
0,9 ml
NaCl
0,1 ml
auf Endoagar
0,1 ml
auf Endoagar
16 Std.
Bebrütung

Wie oben erwähnt, wurden alle Ratten narkotisiert. Hierzu folgt eine kurze Darstellung des Narkoseverfahrens. In einer Petrischale, die ein mit Aether pro narcosi befeuchtetes Wattebäuschchen enthält, werden die Tiere in einen Rauschzustand versetzt. Der Aufenthalt in der Schale muß überwacht werden, da es sonst bei längerer Ätherinhalation zu tödlichen Zwischenfällen kommen kann (eigener Vorversuch). Danach werden die Tiere am Rücken herausgehoben, so daß sich die Bauchhaut anspannt. Dabei kann man mühelos das Narkotikum intraperitoneal injizieren. Nach einigen Minuten sind die Tiere für etwa 2 Stunden in einem Narkosezustand, der ein ungehindertes Arbeiten ermöglicht. Als Narkotikum wurde Pentobarbital (Nembutal^{R}) in einer Dosierung von 0,25mg/kg Körpergewicht benutzt.

Ergebnisse

Zur Prüfung des Impfschutzes wurden am 7.Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe jeweils bei 10 immunisierten Tieren und 10 Kontrolltieren und am 14. Tag bei jeweils 36 immunisierten Tieren und 37 Kontrolltieren folgende Parameter herangezogen.

1. Makroskopische Beurteilung der Nieren nach äußerlich sichtbaren Veränderungen.

   ø keine
   \+ geringe
   ++ mittlere
   +++ starke

2. Keimwachstum pro Niere
   a) Anzahl der Nieren mit positivem Keimwachstum ab 10^2 Keime pro Niere
   b) Gesamtkeimzahl

3. Keimwachstum pro ml Urin
   a) Anzahl der Tiere mit positivem Keimwachstum im Urin ab 10^2 Keime pro ml.
   b) Gesamtkeimzahl

4. Durchschnittliche Gewichtszunahme pro Tier.
5. Durchschnittliche Nierengewichte in % des durchschnittlichen Körpergewichts.

Zur statistischen Prüfung der Ergebnisse wurden die KOLLER'SCHEN Tabellen angewandt (20) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Die statistische Echtheit ist der Quotient aus der beobachteten Differenz Db und der größten zugelassenen Zufallsdifferenz Dz.

$$E = \frac{Db}{Dz}$$

Ist E größer als 1, so ist der Unterschied statistisch gesichert.

Orale Immunisierung

Die Beurteilung der Parameter bei je 10 immunisierten Tieren und 10 Kontrolltieren, die eine Woche nach der zweiten endovesikalen Keimgabe seziert wurden, ergibt bei 4 Parametern statistisch gesicherte Unterschiede (Vergl.Tab. 1 und Abb. 2).

1. 60% der Nieren von Kontrolltieren wiesen makroskopisch sichtbare Läsionen auf, bei den Nieren oral immunisierter Tiere waren es 25%.

2. Die Gesamtkeimzahlen im Urin betrugen bei den oral immunisierten Tieren $2,1 \times 10^4$ und bei den Kontrolltieren $6,8 \times 10^4$.

3. 60% der oral immunisierten Tiere zeigten eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 5% des durchschnittlichen Ausgangsgewichts. 40% der Kontrolltiere zeigten eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 2% des durchschnittlichen Ausgangsgewichts.

4. 45% der Nieren oral immunisierter Tiere zeigten eine Gewichtszunahme von 0,37% des durchschnittlichen Ausgangsgewichts. Bei den Kontrolltieren zeigten alle Nieren (100%) eine Gewichtszunahme von 0,39% des durchschnittlichen Ausgangsgewichts.

TABELLE 1

Ergebnisse am 7. Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe

	Oral immunisierte Tiere n = 1o Tiere = 2o Nieren				Kontrolltiere n = 1o Tiere = 2o Nieren				Statistik		
									D_b	D_z	E
Makroskopische Beurteilung der positiven Läsionen	ø	+	++	+++	ø	+	++	+++			
	15	2	1	2	8	4	4	4			
		5 = 25 %				12 = 60 %			35%	35%	1
Keimwachstum der Nieren	ø		+		ø		+				
	12		8=40 %		10		10 = 50%		10%	35%	0,28
Gesamtkeimzahlen der Nieren	$4,2 \cdot 10^6$				$4,3 \cdot 10^6$						
Keimwachstum im Urin	ø		+		ø		+				
	6		4 = 40 %		5		5 = 50%		10%	35%	0,28
Gesamtkeimzahlen im Urin	$2,1 \cdot 10^4$				$6,8 \cdot 10^4$						
Durchschnittliche Gewichtszunahme/ Tier in % des durchschnittlichen Ausgangsgewichtes	5 % 6 Tiere = 60 %				2 % 4 Tiere = 40 %				20%	20%	1
Durchschnittliche Nierengewichte/ Tier in % des durchschnittlichen Gewichtes bei der Sektion	0,37 % 9 Nieren = 45 %				0,39 % 20 Nieren = 100 %				55%	30%	1,83

14 Tage nach der zweiten endovesikalen Keimgabe ergibt der statistische Vergleich bei je 36 oral immunisierten Tieren und 37 Kontrolltieren bei 6 Parametern statistisch gesicherte Unterschiede (Vergl.Tab. 2 u.Abb.2).

1. Makroskopisch sichtbare Läsionen standen bei 58% der Nieren der Kontrolltiere 22% der Nieren der oral immunisierten Tiere gegenüber.

2. Bei 55% der Nieren von Kontrolltieren findet sich ein positives Keimwachstum. Bei oral immunisierter Tiere weisen 18% positives Keimwachstum auf (Vergl. Abb.3).

3. Ein positives Keimwachstum im Urin fand sich bei 54% der Kontrolltiere und bei 19% der oral immunisierten Tiere (Vergl.Abb.4).

4. Die Gesamtkeimzahlen im Urin betrugen bei den oral immunisierten Tieren 10^3 und bei den Kontrolltieren $5,2 \times 10^6$. Die Gesamtkeimzahlen der Nieren oral immunisierter Tiere betrug $8,4 \times 10^3$ und die der Kontrolltiere $5,8 \times 10^6$.

5. 44% der oral immunisierten Tiere wiesen eine Zunahme von 5,9% des durchschnittlichen Ausgangsgewichts auf, bei den Kontrolltieren wiesen 70% eine Zunahme von 4,5% des durchschnittlichen Ausgangsgewichts auf.

6. Die Nierengewichte zeigten bei 42% der oral immunisierten Tiere eine durchschnittliche Zunahme von 0,36%, bei den Kontrolltieren wiesen 7% eine durchschnittliche Zunahme von 0,35% auf.

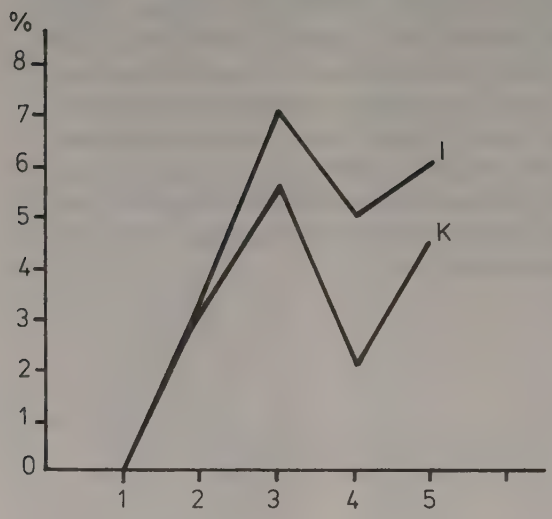
TABELLE 2

Ergebnisse am 14. Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe

	Oral immunisierte Tiere n = 36 Tiere = 72 Nieren				Kontrolltiere n = 37 Tiere = 74 Nieren				Statistik		
	∅	+	++	+++	∅	+	++	+++	D_b	D_z	E
Makroskopische Beurteilung der positiven Läsionen	56	10	3	3	31	20	12	11			
		16 = 22 %				43 = 58 %			36%	18%	2
Keimwachstum der Nieren	∅		+		∅		+				
	59		13 = 18 %		33		41 = 55 %		37%	17%	2,17
Gesamtkeimzahlen der Nieren	$8{,}4 \cdot 10^3$				$5{,}8 \cdot 10^6$						
Keimwachstum im Urin	∅		+		∅		+				
	29		7 = 19 %		17		20 = 54 %		35%	17%	2,0
Gesamtkeimzahlen im Urin	$1 \cdot 10^3$				$5{,}2 \cdot 10^6$						
Durchschnittliche Gewichtszunahme/ Tier in % des durchschnittlichen Ausgangsgewichtes	5,9 % 16 Tiere = 44 %				4,5 % 26 Tiere = 70 %				26%	18%	1,3
Durchschnittliches Nierengewicht/ Tier in % des durchschnittlichen Gewichtes bei der Sektion	0,36% 30 Nieren = 42 %				0,35% 5 Nieren = 7%				35%	18%	1,8

Der Gewichtsverlauf in % des Ausgangsgewichts zeigt am Anfang den gleichen Anstieg. Eine Woche nach der ersten endovesikalen Keimgabe zeigen die Kontrolltiere einen geringeren Anstieg als die immunisierten Tiere. Eine Woche nach der zweiten endovesikalen Keimgabe erleiden beide Gruppen einen Gewichtsverlust, der bei den Kontrolltieren stärker ist als bei den oral immunisierten Tieren. Zwei Wochen nach der zweiten endovesikalen Keimgabe findet ein Wiederanstieg der Gewichte statt, bei den Kontrolltieren steiler jedoch in % des Ausgangsgewichts unter dem der oral immunisierten Tiere.

Abbildung 1: Gewichtsverläufe



1. Ausgangsgewicht - 0% Gewichtszunahme
2. Erste endovesikale Keimgabe
3. Zweite endovesikale Keimgabe
4. 7 Tage } nach endovesikaler Keimgabe
5. 14 Tage }

I: immunisierte Tiere
K: Kontrolltiere

TABELLE 3

	1	2	3	4	5
K	0	3,0%	5,5%	2%	4,5%
I	0	3,1%	7%	5%	5,9%

Abb. 2: Makroskopische Beurteilung

Graphischer Vergleich der prozentualen Anteile makroskopisch sichtbarer Läsionen der Nieren von immunisierten Tieren und Kontrolltieren am 7. und 14. Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe.

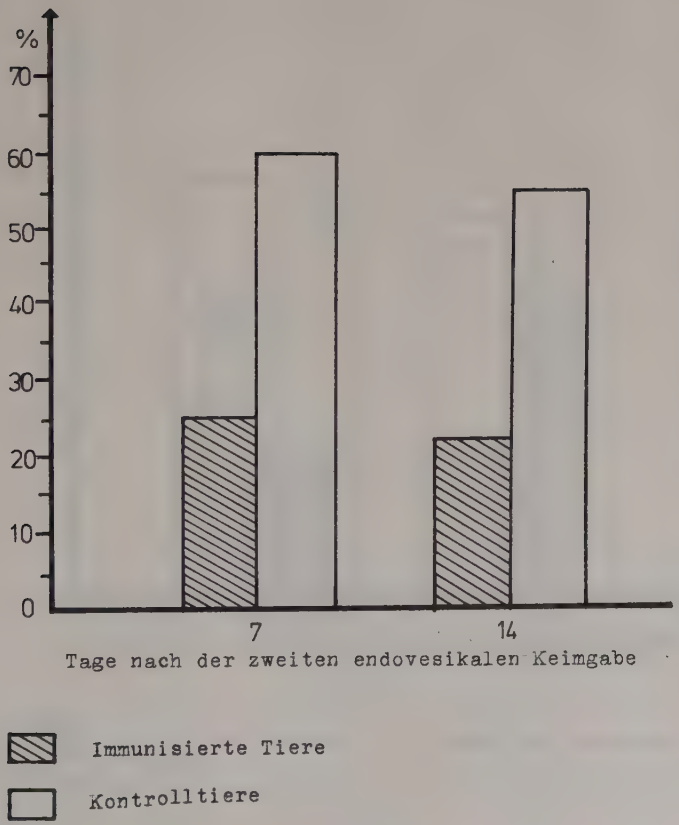


Abb. 3: Keimwachstum der Nieren

Graphischer Vergleich der prozentualen Anteile von Nieren mit positivem Keimwachstum bei immunisierten Tieren und Kontrolltieren am 7. und 14. Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe.

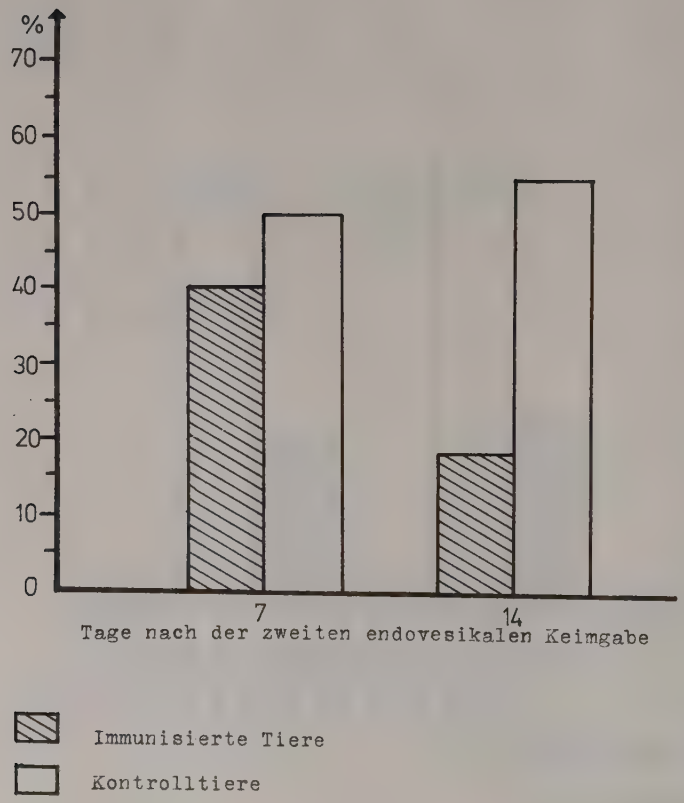
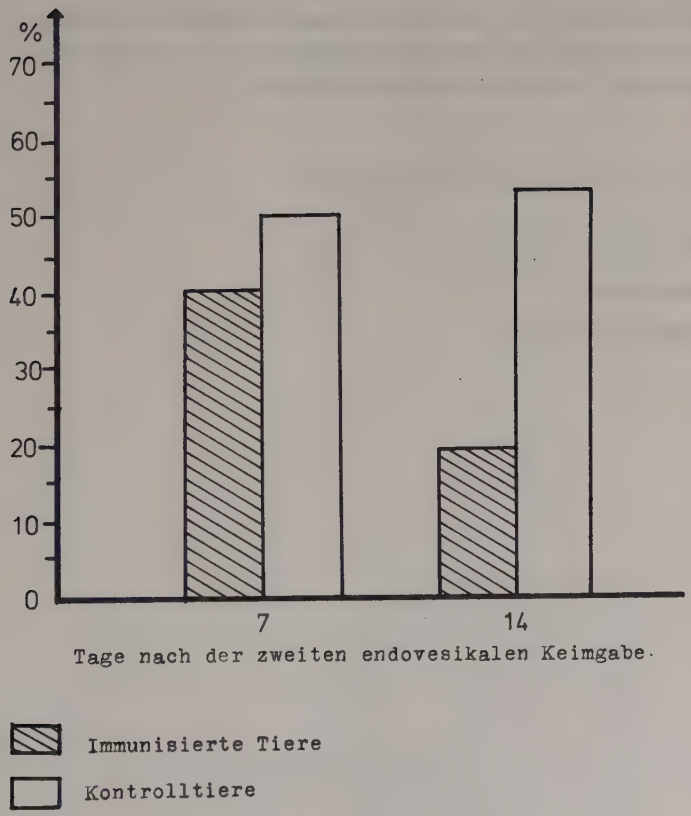


Abb. 4: Keimwachstum im Urin

Vergleich der prozentualen Anteile von Nieren mit positivem Keimwachstum im Urin bei immunisierten Tieren und Kontrolltieren am 7. und 14. Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe.



Endovesikale Immunisierung

Als Versuchstiere dienten auch hier Albino-Wisterratten, die denselben Bedingungen unterworfen waren wie die der ersten Gruppe. Von 70 Tieren mit einem durchschnittlichen Ausgangsgewicht von 200 g bekamen 35 Tiere eine 6malige Impfstoffgabe transurethral endovesikal in Pentobarbitalnarkose jeweils mit einem Tag Pause zwischen zwei Gaben.
7 und 14 Tage nach der letzten Impfstoffgabe wurde allen Tieren jeweils 1 ml einer Suspension von 10^9 Keimen E. coli O 2:1:4 transurethral endovesikal in Pentobarbitalnarkose instilliert.
7 Tage nach der letzten Keiminstillation wurden jeweils 10 endovesikal immunisierte Tiere und 10 Kontrolltiere in Narkose getötet und seziert. 14 Tage nach der zweiten endovesikalen Keimgabe wurden jeweils 26 endovesikal immunisierte Tiere und 26 Kontrolltiere in Narkose getötet und seziert.

Folgende Parameter wurden herangezogen:

1. Makroskopische Beurteilung der Nieren
2. Keimwachstum
3. Keimwachstum im Urin

7 Tage nach der zweiten Keiminstillation zeigt die statistische Beurteilung der herangezogenen Parameter bei je 9 endovesikal immunisierten Tieren und 8 Kontrolltieren folgende Ergebnisse (Vergl.Tab.4 u.Abb. 5, 6 u.7):

1. 61% der Nieren von endovesikal immunisierten Tieren wiesen deutliche,makroskopisch sichtbare Veränderungen auf. Bei den Nieren der Kontrolltiere waren es 50%.

2. 88% der Nieren von endovesikal immunisierten Tieren wiesen ein positives Keimwachstum auf. Bei den Nieren der Kontrolltiere waren es 68%.

3. 88% der endovesikal immunisierten Tiere hatten ein positives Keimwachstum im Urin. Bei den Kontrolltieren waren es 50%.

TABELLE 4

Ergebnisse am 7. Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe

	endovesikal immunisierte Tiere n = 9 Tiere = 18 Nieren				Kontrolltiere n = 8 Tiere = 16 Nieren				Statistik		
	∅	+	++	+++	∅	+	++	+++	D_b	D_z	E
Makroskopische Beurteilung der positiven Läsionen	7	1	4	6	8	2	2	4			
		11 = 61 %				8 = 50 %			11%	40%	-0,2
	∅	+			∅	+					
Keimwachstum der Nieren	2	16 = 88 %			5	11 = 68 %			20%	40%	-0,5
	∅	+			∅	+					
Keimwachstum im Urin	1	8 = 88 %			4	4 = 50 %			38%	40%	-0,95

14 Tage nach der zweiten endovesikalen Keiminstillation zeigen 62% der Nieren von endovesikal immunisierten Tieren makroskopisch sichtbare Läsionen. Bei den Kontrolltieren sind es 51% (Vergl.Tab. 5 u.Abb.5,6 u.7).
50% der endovesikal immunisierten Tiere zeigen ein positives Keimwachstum im Urin. Bei den Kontrolltieren sind es 57%. 78% der Nieren von endovesikal immunisierten Tieren haben ein positives Keimwachstum.. Bei den Kontrolltieren sind es 56%.
Die endovesikale, lokale Immunisierung hat nach dem in den Tabellen und Abbildungen vorgelegten Material keinen Impfschutz vermitteln können. Im Gegenteil sind die lokal immunisierten Tiere schlechter gestellt als die Kontrolltiere. In der Diskussion wird über die möglichen Ursachen dieser offenbar vorliegenden Schädigung gesprochen werden.

TABELLE 5

Ergebnisse am 14. Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe

	endovesikal immunisierte Tiere n = 26 Tiere = 52 Nieren				Kontrolltiere n = 26 Tiere = 52 Nieren				Statistik		
									D_b	D_z	E
Makroskopische Beurteilung der positiven Läsionen	ø	+	++	+++	ø	+	++	+++			
	20	16	9	7	25	10	10	7			
		32 = 62 %				27 = 51 %			-11%	21%	-0,51
Keimwachstum der Nieren	ø		+		ø		+				
	11		41 = 78 %		23		29 = 56 %		-22%	21%	-1,0
Keimwachstum im Urin	ø		+		ø		+				
	13		13 = 50 %		11		15 = 57 %		+7%	21%	0,33

Abb. 5: Makroskopische Beurteilung

Vergleich der prozentualen Anteile makroskopisch sichtbarer Läsionen der Nieren von endovesikal immunisierten Tieren und Kontrolltieren am 7. und 14. Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe.

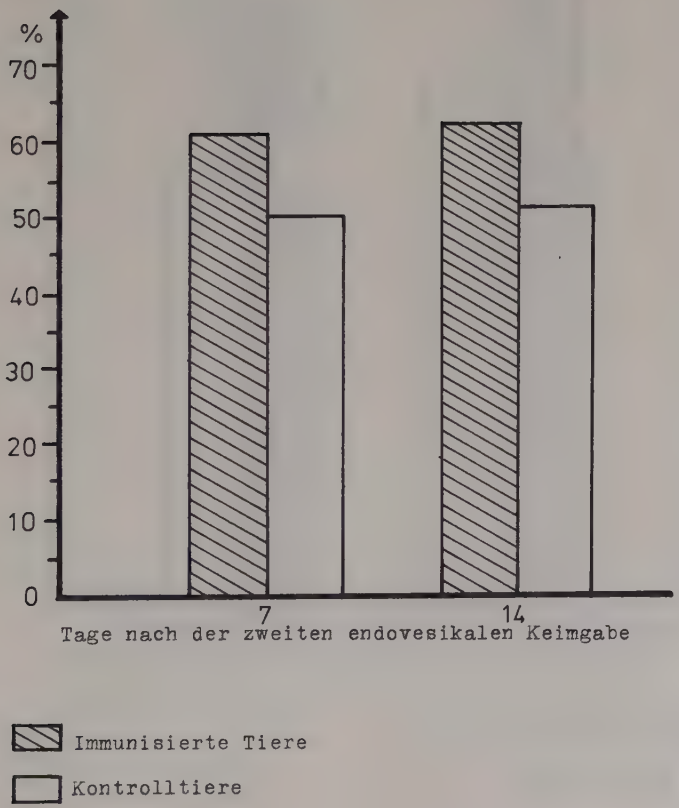


Abb. 6: Keimwachstum der Nieren

Vergleich der prozentualen Anteile von Nieren mit positivem Keimwachstum bei endovesikal immunisierten Tieren und Kontrolltieren am 7. und 14. Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe.

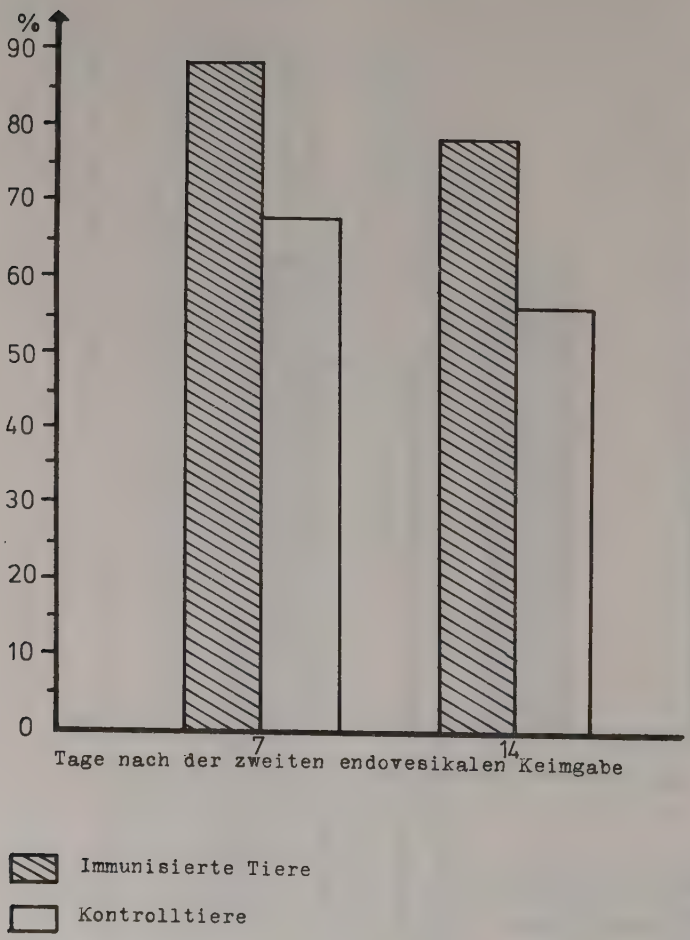
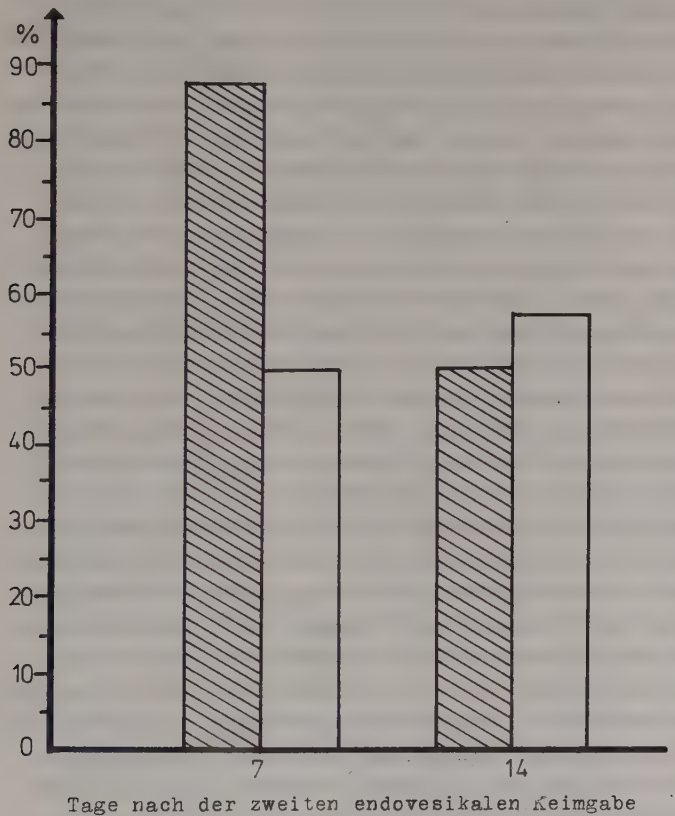


Abb. 7:

Graphischer Vergleich der prozentualen Anteile von Tieren mit positivem Keimwachstum im Urin bei endovesikal immunisierten Tieren und Kontrolltieren am 7. und 14. Tag nach der zweiten endovesikalen Keimgabe.



Diskussion

Eine Modellpyelonephritis kann man hämatogen oder retrograd herbeiführen. Dies entspricht der heute wieder in den Vordergrund gerückten aszendierenden Infektion (25).
Die Infektion in dieser Arbeit erfolgte durch die transurethrale endovesikale Instillation von 1 ml einer E. coli O 2:1:4 - Suspension. Die Anwesenheit von Keimen allein in den Harnwegen verursacht häufig eine passagere Bakteriurie, in wenigen Ausnahmen eine manifeste Infektion (18,25,46,47). Zu einer typischen Pyelonephritis kommt es erst durch zusätzliche "Manipulationen" im Sinne einer Infektbahnung durch temporäre Ureterligatur, Drosselung der Arteria oder Vena renalis, Massage der Harnblase, Traumatisierung des Nierenmarks oder des Nierenbeckens und schliesslich hormonell durch Östradiolundecyclat (Progynon Depot^{R}) bei einer Dosierung von 0,5 mg/kg und Woche i.m. (25,39,46,47). Der retrograde Weg führt durch den bekannten vesiko-urethralen Reflux, der bei Steigerung der Druckverhältnisse in der Blase (Prostataadenom, Tumoren, Stenosen oder Mißbildungen) oder einfach durch den Instillationsdruck zu einer Keimaszendierung führt.
Bei dieser Arbeit benutzte ich den Keim E. coli O 2:1:4 ohne zusätzliche Bahnung der Infektion. Bei diesem Keim ist sowohl eine hohe Infektionsrate (bis 77%) als auch eine Letalitätsquote von 60% beschrieben (17,39,47). Als Infektionsbeweis gilt in der Niere 10^2 Keime pro g und im Urin 10^1 Keime pro ml (36,37,47). Zur Beurteilung der Wirkung dieser Infektion auf geimpfte und ungeimpfte Tiere wurden verschiedene Parameter herangezogen. Eine Woche nach der zweiten endovesikalen Keimgabe lagen die makroskopisch sichtbaren Läsionen der Nieren mit 25% gegenüber 60% deutlich zugunsten der oral immunisierten Tiere. Das Keimwachstum der Nieren der oral immunisierten Tiere lag mit 40% im Vergleich zu den Kontrolltieren mit 50%, wenn auch nicht signifikant, niedriger. Die Gesamtkeimzahl im Urin lag bei den oral immunisierten Tieren mit $2,1 \times 10^4$ deutlich niedriger als die der Kontrolltiere mit $6,8 \times 10^4$.

Zwei Wochen nach der zweiten endovesikalen Keimgabe sind sämtliche Parameter deutlich zugunsten der oral immunisierten Tiere signifikant ausgefallen. Hier sind die makroskopisch sichtbaren Läsionen mit 22% bei den oral immunisierten Tieren deutlich niedriger als bei den Kontrolltieren mit 58%. Für einen wirksamen Impfschutz spricht auch das Keimwachstum in den Nieren und im Urin von 18% bzw. 19% der oral immunisierten Tiere. Durch das positive Keimwachstum von 55% bzw. 54% in den Nieren und im Urin der Kontrolltiere zeigt sich hier eine deutliche Infektion. Die Gesamtkeimzahl der Nieren von Kontrolltieren war mit $5,8 \times 10^6$ Keime 690 mal höher als die bei den oral immunisierten Tieren mit $8,4 \times 10^3$ Keimen (Vergl.Tab.2). Die Urinbefunde zeigten ähnliche Unterschiede. BEi den Kontrolltieren war die Gesamtkeimzahl mit $5,2 \times 10^6$ gegenüber bei den oral immunisierten Tieren 5200 mal höher, was für die Wirksamkeit der oralen Immunisierung spricht. Eine geringere Gewichtszunahme der Kontrolltiere im Vergleich zu den oral immunisierten Tieren läßt sich bis zur zweiten endovesikalen Keimgabe nachweisen (Vergl.Abb.1). Nach einer weiteren Woche nimmt das Gewicht der Kontrolltiere im Vergleich zu dem der oral immunisierten Tiere deutlich ab. Auch dies ist als Infektionswirkung anzusehen. Eine Woche nach der zweiten endovesikalen Keimgabe zeigen die oral immunisierten Tiere eine Gewichtszunahme von5% des Ausgangsgewichts, die Kontrolltiere dagegen eine Zunahme von nur 2 %. Dies würde für einen Impfschutz im akuten Stadium der Erkrankung sprechen, denn zwei Wochen nach der zweiten endovesikalen Keimgabe betrugen die Gewichtszunahmen 5,9% bei den oral immunisierten Tieren und 4,5% bei den Kontrolltieren. Dieses Verhalten wird deutlicher bei den Nieren als Sitz der Infektion. Hier zeigt sich eine Zunahme in der ersten Woche nach der zweiten endovesikalen Keimgabe bei beiden Gruppen, allerdings bei den Kontrolltieren bei allen Nieren eine höhere Zunahme als bei den oral immunisierten Tieren (Vergl.Tab.1). Zwei Wochen nach der zweiten endovesikalen Keimgabe nehmen 42% der Nieren oral immunisierter Tiere um 0,36% des Ausgangsgewichts zu, bei den Kontrolltieren zeigen 7% der Nieren eine Zunahme von 0,35% des Ausgangsgewichts. Die Nieren der Kontrolltiere waren untergewichtig.

Makroskopisch sieht man in der ersten Woche nach der zweiten endovesikalen Keimgabe neben geringer Schwellung der Nieren kleine, subkapsuläre Rindenabszesse. Die Schnittfläche der Nieren zeigt gelbliche, vom Nierenbecken bis zur Rinde verlaufende Streifen. Die Nierenbeckenschleimhaut ist gerötet, gefäßinjiziert und von Exsudat bedeckt. Nach der zweiten Woche weist die Nierenoberfläche eine Unregelmäßigkeit des Reliefs mit teils punktförmigen, teils großflächigen Einziehungen auf, die als Narben zu bewerten sind. Beim größten Teil der Kontrolltiere erschienen die Nieren stark geschrumpft. Eine zusätzliche histologische Untersuchung würde hier weitere Aufschlüsse geben. WESTENDORF (47) fand drei Wochen nach der zweiten endovesikalen Keimgabe bei den Nieren oral immunisierter Tiere eine höhere Keimzahl als bei den Nieren der Kontrolltiere. Er diskutierte eine mögliche Begünstigung der Entstehung einer chronischen Pyelonephritis durch die orale Immunisierung. Diese Spätschädigung der Nieren ist möglicherweise durch das zur Infektbahnung gegebene Östrogen entstanden. Eine Herabsetzung der Infektabwehr durch Östrogene ist beschrieben (7).

Bei der endovesikalen Immunisierung wurde bei dieser Arbeit auch die transurethrale endovesikale Keiminstillation in Narkose gewählt, um auch auf diesem Wege eine Immunisierung zu erzielen. Obwohl statistisch nicht gesichert, läßt sich anhand von Tabelle 4 und 5 folgendes sagen: Eine Woche nach der zweiten endovesikalen Keimgabe lagen die makroskopisch sichtbaren Läsionen mit 61% gegenüber 50%, das Keimwachstum im Urin mit 88% gegenüber 68% und das Keimwachstum in den Nieren mit 88% gegenüber 50% bei den endovesikal immunisierten Tieren deutlich höher als bei den Kontrolltieren. Zwei Wochen nach der zweiten endovesikalen Keimgabe zeigten sich ähnliche Unterschiede: Makroskopisch sichtbare Läsionen 62% gegenüber 50%. Keimwachstum im Urin 50% gegenüber 57%. Keimwachstum in den Nieren 78% gegenüber 56%. Die höhere Infektionsrate bei den endovesikal immunisierten Tieren deutet auf ein Versagen der Impfung hin. Die höheren Vergleichszahlen bei den endovesikal immunisierten Tieren bekräftigen die Ansicht von SACK und Mitarb. (39), daß die alleinige Instillation von 1 ml physiologischer Kochsalz-

lösung in die Harnblase zu histologisch nachweisbaren Mikroverletzungen der Nieren führt. Die Frequenz der Instillation des Impfstoffs, die jedes Mal eine Narkose erforderlich machte, bewirkt anscheinend eine chronische Reizung der Harnblase mit entsprechenden Konsequenzen. Die regelmäßigen Instillationen in Narkose scheinen eine allgemeine Abwehrschwäche der Tiere zu begünstigen. Beobachtet wurden außerdem die Bildung von Blasenkonkrementen, Megaureteren und Ureterstrikturen. In einigen Fällen kam es zu einer akuten hämorrhagisch-nekrotésierenden Cystitis mit letalem Ausgang. Durch alle diese Faktoren kam es zu einer Art Infektbahnung ohne vorhandenen Impfschutz. Eine endovesikale Immunisierung auf retrogradem Wege ist somit nicht möglich.
Zusammenfassend ist festzustellen, daß eine orale Immunisierung mit hitzeinaktivierten E. coli O 2:1:4 gegen eine experimentelle retrograde Pyelonephritis durchaus brauchbar ist. Der Schutz der Niere gegen die Infektion ist deutlich. Bemerkenswert aber ist die Tatsache, daß gerade die endovesikale lokale Immunisierung versagt. Das oral aufgenommene Antigen gelangt durch die Darmwand und wird in den Körper durch Persorption aufgenommen. Wie RAETTIG und BUSE nachweisen konnten (36, 37), finden sich im Körper des Impflings und besonders in der Darmwand immunkompetente Zellen, die die Fähigkeit besitzen, bei einer Infektion schnell mit einer Ausschüttung von Immunglobulinen zureagieren. Dies erklärt den Erfolg der oralen Immunisierung auch im Falle der Niere.
Man bedenke die Zahl der Harnwegsinfekte, die unerkannt bleiben und früher oder später zu einer Pyelonephritis führen und dies besonders beigefährdeten Personen.
KUNIN (23) wies bei Kindern mit Harnwegsinfekten in 84% E. coli nach, und KIENITZ (25) fand bei sämtlichen Harnuntersuchungen E. coli an erster Stelle mit 44% vertreten. Auch eine diagnostizierte Pyelonephritis pflegt schwer therapierbar zu sein (Irreführung durch negativen Urinbefund bei

noch vorhandenen Erregern im Parenchym) (26). Aus diesen Gründen ist die Suche nach einem Impfstoff gegen Pyelonephritiden zu befürworten. Da die sogenannten pyelopathogenen Colibakterien zwar für 60-70% der Pyelonephritiden verantwortlich gemacht werden (26), aber auch noch andere Keime in Frage kommen (Proteus, Klebsiella, Pseudomonas), wäre ein polyvalenter Impfstoff wünschenswert.

Zusammenfassung

An 93 weiblichen Ratten wurde die Wirkung einer oralen Immunisierung und an 69 weiblichen Ratten die einer endovesikalen Immunisierung mit hitzeinaktivierten E. coli O 2:1:4-Bakterien gegen eine experimentelle retrograde Pyelonephritis desselben Stammes ohne Infektbahnung untersucht. Es wurden dabei mehrere Parameter herangezogen, die an zwei verschiedenen Zeitpunkten zwischen jeweils gleichgroßen Gruppen von immunisierten Tieren und Kontrolltieren verglichen wurden. Die orale Immunisierung zeigte einen deutlichen Impfschutz. Der Versuch einer endovesikalen Immunisierung erwies sich nicht nur als unbrauchbar sondern eher gefährdend; die Gründe für dieses Versagen einer lokalen Immunisierung werden diskutiert.

Literatur

1. ANDERSEN, B.R.
JACKSON, G.G.
Resistent pyelitis and pyelonephritis from retrograde urinary tract infection with a strain of Klebsiella in rats. (J. Lab. Clin. Med. 60, 457-467, 1962).

2. ARANA-SIALER, J.A.
KOZIJ, B.S.
JACKSON, G.G.
Effect of alterations in humoral and cellular host defense mechanisms on the pathogenesis of retrograde pyelonephritis. (J. Lab. Clin. Med. 60, 856, 1962).

3. ARANA, J.A.
KOZIJ, V.M.
Retrograde E. coli urinary tract infections in rats. (Arch. Path. 78, 558-567, 1964).

4. ARANA, J.A.
KOZIJ, V.M.
JACKSON, G.G.
The immunologie status of the host and pyelonephritis: Astudy of retrograde E. coli urinary tract infections in rats. (J. Immunol. 94, 337-343, 1965).

5. BRAUDE, A.I.
SHAPIRO, A.P.
SIMIENSKI, J.
Hematogenus pyelonephritis in rats. I. Its pathogenesis when produced by a simple new method. (J. Clin. Invest. 34, 1489-1497, 1955).

6. BREUEL, H.-P.
Lokale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. (Inaug.-Diss. FU Berlin 1969).

7. COMMICHAU, R.
HENKEL, W.
KOCH, H.G.
SACK, K.
Hormonal gebahnte nicht obstruktive Koli-Pyelonephritis. (Pyelonephritis III, S. 31, Hrsg.: H. Losse und M. Kienitz, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1972).

8. COTRAN, R.S.
THRUPP, L.D.
Retrograde E. coli pyelonephritis in the rat: A bacteriologic, pathologic and fluorescent study. (J. Clin. Med. 61, 987-1004, 1963).

9. DESAUX, P.
PRETET, J.
Réactions cutanées après ingestion de vaccins entérococcique on coli baccilaire. (Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 137, 382, 1940).

10. DOMINGUE, G.
SALHI, A.
ROUNTREE, C.
LITTLE, W.
Prevention of experimental hematogenous and retrograde pyelonephritis by antibodies against enterobacterial common antigen. (Infec. Immun. 2, 175-182, 1970).

11. FITZPATRICK, F.K.
GIRARD, A.E.
Pyelonephritis in the mouse. II. Vaccination studies. (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 127, 579-585, 1967).

12. FIVEASH, J.G.
FOSTERE, A.
Antibody response in lower urinary tract infections (J. Urol. 92, 545-548, 1964).

13. FULKERSON, C.C.
Hospitalismus - Infektionsrate. (Med. Trib. 7, 10, 1972).

14. GOLOVANOFF, M.
De la vaccination anticolibaccilaire. Etude de l'immunité locale. (Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 88, 424, 1928).

15. GWAN, O.S.
Recherche sur l'immunité anticolibaccilaire. (Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 131, 446 u. 447, 1938).

16. HATALA, M.
PRAT, V.
BENNESOVA, D.
Bacteriuria and inflammatory renal changes in rabbits with both kidneys after unilateral nephrektomie in E. coli bacteriaemia. (Zbl. Bakt. 189, 61-76, 1963).

17. HENKEL, W.
COMMICHAU, R.
Serumresistenz und Nephropathogenität antigenetisch definierter Stämme von E. coli. III. Experimentelle Pyelonephritis mit unterschiedlich serumresistenten Keimen. (Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 156, 297-304, 1971).

18. HEPTIMSTALL, R.H.
Experimental Pyelonephritis. Bacteriological studies on the ascending route of infection in the rat. (Nephron 1, 73-92, 1964).

19. HUNTER, B.W.
AKINS, L.L.
SANFORD, J.P.
Acquired resistance to reinfection in experimental ascending pyelonephritis. (J. Lab. Clin. Med. 58, 827, 1961).

2o. KOLLER, S.
Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. (Steinkopf-Verlag, Darmstadt, 4. Aufl. 1969).

21. KORDES, E.
Orale Immunisierung von Mäusen mit Impfstoffen aus physikalisch inaktivierten S.t.m.-Bakterien. (Inaug.-Diss. FU Berlin 1969).

22. KORDES, I.
Vergleichende Tierexperimente mit Impfstoffen aus chemisch inaktivierten S.t.m.-Bakterien bei oraler und subkutaner Immunisierung. (Inaug.-Diss. FU Berlin 1969).

23. KUNIN, C.M.
HAMALGYI, N.E.
Urinary-tract infections in school children. II. Characterization of invading organism. (New Engl. J. Merd. 266, 1297-1301, 1962).

24. LODENKAEMPFER, H.
Über das Problem der oralen Immunisierung. (Wiener Med. Wschr. 114, 860, 1964).

25. LOSSE, H.
KIENITZ, M.
Pyelonephritis. Forschungsergebnisse 1966 (S. 71-96, Georg Thieme Verlag, Stuttgart).

26. LOSSE, H.
KIENITZ, M.
Die Pyelonephritis (S. 19-42, Georg Thieme Verlag, Stuttgart).

27. MEVES, M.
Aufnahme und Verteilung von radiomarkiertem Antigen von S. typhi murium in der Maus bei oraler und rectaler Anwendung. (Inaug.-Diss. FU Berlin 1966).

28. MOCHMANN, H.
OCKLITZ, H.W.
SCHMIDT, E.F.
HERING, L.
MILLECK, J.
Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natrium-desoxycholat-Extrakt aus Dyspepsie-Coli-Stämmen. III. Mitt.: Die Schutzwirkung des Extraktes im aktiven Mäuseschutzversuch. (Zbl. Bakt. I. Orig. 203, 314-325, 1967).

29. NIIJIMA, T.
HINMAN, F.
Effect of prior bacterial immunisation on the pathogenesis of retrograde pyelonephritis. (J. Urol. 95, 476-484, 1966).

30. PETER, A.
Beobachtungen über parenterales Auftreten oral verabfolgter fütterungspathogener Mikroorganismen. (Zbl. Bakt. 201, 1966).

31. PRAT, V.
KONICKOVA, L.
RITZERFELD, W.
LOSSE, H.
Zur Beurteilung bakteriologischer Urin- und Nierengewebsbefunde bei experimenteller E. coli-Pyelonephritis. (Fortsch. Med. 86, 917-919, 1968).

32. PRAT, V.
KONICKOVA, L.
RITZERFELD, W.
LOSSE, H.
Die Bedeutung einer vorübergehenden Harnleiterobstruktion für die Entstehung von aszendierenden Niereninfektionen. (Zschr. ges. Exp. Med. 146, 115-124, 1968)

33. RAETTIG, H.
Tierexperimente zur Resorptionsvirämie. (Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 192, 534-538, 1964).

34. RAETTIG, H.
Tierexperimente zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für Viren. (Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 191, 97-103, 1963).

35. RAETTIG, H.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 3. Mitt.: Dosierung und Impfrhythmus bei der spezifischen Impfung der Maus gegen Salmonellen-Enteritis (Zbl. Bakt. I. Orig. 203, 478, 1967).

36. RAETTIG, H.
BUSE, A.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 4. Mitt.: Serumantikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellen-Enteritis. (Zbl. Bakt. 204, 221-231, 1967).

37. RAETTIG, H.
Die orale Impfung mit inaktivierten Mikroorganismen. Zehn Jahre Forschungsarbeit im Robert-Koch-Institut. Sonderdruck aus "Bundesgesundheitsblatt" 14. Jahrg. Nr. 11, S. 141-147.

38. ROCHA, H.
DEALMEIDA, S.S.
Experimental pyelonephritis in rats with a glass bead in the bladder. (J. Path. Bact. 90, 668-672, 1965).

39. SACK, K.
FREIESLEBEN, H.
WOEHRMANN, W.
HENKEL, W.
COMMICHAU, R.
Experimentelle Beiträge zum Infektionsweg der Coli-Pyelonephritis. (Virchows Arch. Abt. A, Path. Anat. 355, 323, 332, 1972).

40. SANFORD, J.P.
HUNTER, R.W.
SONDA, I.L.
The role of immunity in the pathogenesis of experimental hematogenous pyelonephritis. (J. Exp. Med. 115, 383, 1961).

41. SANFORD, J.P.
BARNETT, J.A.
Immunologic responses in urinary-tract infections. (J. Am. Med. Assoc. 192, 587-596, 1965).

42. SCHLEWINSKI, E.
Bakteriämie nach enteraler Resorption von Staphylokokken und vergleichende lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen. (Inaug.-Diss. FU Berlin 1970).

43. TORIKATA, R.
TMAIZUMI, M.
Zum Unterschied zwischen der Infektions- und der oralen Immunisierung. (Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 133, 195, 1939).

44. UECKER, W.
MEVES, M.
RAETTIG, H.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 6. Mitt.: Tierversuche zur Resorption und Sekretion von radiomarkiertem, bakteriellem Antigen. (Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 208, 2-15, 1868).

45. VOLKHEIMER, G.
Über Resorption und Ausscheidung von intakten Hefezellen. (Zbl. Bakt. Orig. 192, 121, 1964).

46. WEYRAUCH, H.M.
ROSENBERG, M.L.
AMAR, A.O.
Effects of antibiotics and vaccination on experimental pyelonephritis. (J. Urol. 78, 532-539, 1957).

47. WESTENDORF, I.
Wirkung einer spezifischen oralen Impfung mit hitzeinaktivierten Colibakterien auf eine experimentelle retrograde Coli-Pyelonephritis weiblicher Ratten. (Inaug.-Diss. FU Berlin 1973).

48. YOSHIDA, E.
Über die Immunisierung per os. (Arch. f. Hyg. 69, 21, 1909).

Ich danke Herrn Professor Dr.med. Hansjürgen RAETTIG für die Überlassung des Themas und ihm sowie den Mitarbeitern seiner Abteilung, besonders der Medizinisch-Technischen Assistentin Christa JASCHINSKI, für die hilfreiche Unterstützung bei der Arbeit.

Herrn Professor Dr.med. W. HENKEL vom Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Akademie Lübeck für die Übersendung des Keims. Mein Dank gilt auch meinem Freund und Kollegen Dr.med. I. WESTENDORF für die Einarbeitung in der Technik der retrograden endovesikalen Keiminstillation.

Lebenslauf

Am 15.April 1940 wurde ich als Sohn des Landwirtes Abdallah Gharbi und dessen Ehefrau Aicha Gharbi,geb. Soumeur, in Beja/Tunesien geboren.

1946 Grundschule in Beja

1961 Baccalaureat de l'enseignement secondaire im College Sadiki Khaznadar zu Tunis.

Oktober 1961 kam ich nach Berlin innerhalb einer Gruppe tunesischer Studenten, aufgrund eines Stipendiums der tunesischen Regierung.

1.11.1961 bis zum 27.2.1962 Goethe-Institut Berlin-Grunewald, wo ich die deutsche Sprache erlernte.

1962 S.S. an der Universität Heidelberg immatrikuliert

Ab 16.11.1962 war ich an der Freien Universität Berlin eingeschrieben, wo ich 1965 die ärztliche Vorprüfung und 1969 das Staatsexamen mit Erfolg ablegte.

Seit März 1969 im Städtischen Humboldt-Krankenhaus tätig.

Seit Oktober 1975 bin ich Facharzt für Chirurgie

F. Höpfner - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198